动 物 学 研 究 2012，Aug. 33(4): 395−401 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.04395

多疣壁虎 *tubulin beta* 3 基因克隆和多克隆抗体制备

李 静[1,2], 秦 勇[1], 顾 云[1], 刘 炎[1,*], 刘 梅[1,*]

(1. 南通大学 江苏省神经再生重点实验室, 江苏 南通 226001; 2. 浙江省湖州市中心医院 中心实验室, 浙江 湖州 313000)

摘要：Tubulin beta 3 (TUBB3) 是特异表达于神经元的微管蛋白 tubulin beta 家族成员, 被认为在维持轴突正常状态起着重要作用, 是神经元特异的标志蛋白。该研究旨在获得多疣壁虎 TUBB3 全长 cDNA 序列并制备其多克隆抗体, 为进一步研究多疣壁虎断尾再生提供基因和抗体工具。根据多疣壁虎中枢神经组织 cDNA 文库中 TUBB3 的 EST 片段序列, 采用 RACE-PCR 方法, 获得了全长 cDNA, 序列全长 1 790 bp, 编码 450 个氨基酸, 与其他物种 TUBB3 蛋白高度同源; RT-PCR 方法 和 Northern blotting 检测了 TUBB3 组织表达谱及其转录本的大小; 在 GenBank 登录号为 JQ080315; NJ 法构建的系统进化树分析表明，多疣壁虎的 TUBB3 蛋白与鸡的 TUBB3 蛋白在进化距离上较近; 构建 pET-32a-TUBB3 原核表达载体, 诱导表达并纯化 TUBB3 蛋白, 获得兔抗壁虎 TUBB3 多克隆抗体, ELISA 检测其效价大于 1:65 536, Western blotting 方法证实所制备的多克隆抗体可特异识别多疣壁虎神经组织的的 TUBB3 蛋白。

关键词：多疣壁虎; Tubulin beta 3; 分子克隆; 多克隆抗体
中图分类号：Q959.62; Q349; Q786; Q511 **文献标志码：**A **文章编号：**0254-5853-(2012)04-0395-06

Molecular cloning of tubulin beta 3 (*TUBB3*) in *Gekko japonicus* and preparation of its polyclonal antibody

LI Jing[1,2], QIN Yong[1], GU Yun[1], LIU Yan[1,*], LIU Mei[1,*]

(1. *Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration*, *Nantong University*, *Nantong* 226001, *China*;
2. *Clinical Laboratory*, *the Central Hospital of Huzhou*, *Huzhou* 313000, *China*)

Abstract: The tubulin beta III (*TUBB3*) gene encodes a class III member of the beta tubulin protein family that is primarily expressed in neurons and is considered to play a critical role in proper axon guidance and maintenance. This protein is generally used as a specific marker of neurons in the central nervous system. We obtained the full length cDNA sequence of *TUBB3* by using the RACE method based on the EST fragment from the brain and spinal cord cDNA library of *Gekko japonicus*. We further investigated the multi-tissue expression pattern by RT-PCR and identified one transcript of TUBB3 about 1.8 kb in the central nervous system of *Gekko japonicus* by Northern blotting. The completed cDNA of gecko TUBB3 is 1 790 bp with an open reading frame of 1 350 bp, encoding a 450 amino-acid protein. The recombinant plasmid of pET-32a-TUBB3 was constructed and induced to express His-tagged TUBB3 protein in prokaryotic BL21 cells. The purified TUBB3 protein was then used to immunize rabbits to generate polyclonal antisera. The titer of the antiserum was more than 1:65 536 determined by ELISA. The result of western blotting showed that the TUBB3 antibody could specifically recognize the recombinant TUBB3 protein and endogenous TUBB3 protein. Our findings provide the tools to further understand the *TUBB3* gene and investigate the regeneration of the central nervous system in *Gekko japonicas*.

Key words: *Gekko japonicus*; Tubulin beta 3 (TUBB3); Molecular cloning; Polyclonal antibody

微管蛋白 (tubulin) 是细胞骨架结构中微管 (microtubule) 的一个组成成分, 主要分为α-管蛋白 (α-tubulin)、 β-管蛋白 (β-tubulin)、 γ-管蛋白 (γ-tubulin) 等, α, β-管蛋白形成的异二聚体是构成

收稿日期：2012-02-01；接受日期：2012-05-15
基金项目：国家自然科学基金 (31071874, 31171007); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏省高校自然科学研究重大项目 (09KJA180005, 11KJA180004); 南通大学自然科学基金前期预研项目资助
*通信作者(Corresponding authors)，E-mail: 刘梅, 博士, 教授, 硕士生导师, Tel:0513-85051852, Email: liumei@ntu.edu.cn; 刘炎, 博士, 教授, 硕士生导师, Tel:0513-85051852, Email: liuyan@ntu.edu.cn
第一作者简介：李静 (1983－), 女, 硕士, 研究方向为细胞和分子神经生物学

微管的主要单位, γ-管蛋白则对微管的形成、细胞极性的确定起着重要的作用 (Burns, 1991)。这些微管蛋白的异常则会引起神经组织的发育异常和多方面的功能障碍(Abdollahi et al, 2009; Jaglin et al, 2009; Keays et al, 2007)。α, β, γ - tubulin 分别有众多亚型, 其中 tubulin beta 3 (TUBB3) 在神经元中特异性表达, 可影响神经元的极性, 常作为标记性蛋白应用于神经组织相关的研究中 (Hoffman, 1988; Isaev et al, 2012; Kobayashi & Mundel, 1998)。因此, TUBB3 作为神经组织细胞结构一个特异性的组成成分, 成为我们在神经发育和神经再生研究中的目标蛋白之一, 多疣壁虎(*Gekko japonicus*, Gecko)以其尾部离断后能够进行完整的形态再生和功能恢复而成为本实验室关注的神经再生的研究对象, 而明确其神经组织中各种相关的分子和蛋白的结构和功能可以为神经再生研究的深入进行奠定基础。然而, 壁虎是较哺乳类低等的爬行类脊椎动物, 与人和大、小鼠以及其他的哺乳类动物的种属差异较大, 在实验过程中一些特异性蛋白和抗体的应用常受到限制, 因此, 与神经组织相关的壁虎特异性抗体的制备将有助于研究的进行, 而 TUBB3 即成为我们研究的众多目标蛋白之一

在本实验室先前的研究中, 我们已经构建了多疣壁虎中枢神经组织的cDNA 文库 (Liu et al, 2006), 其中包括 TUBB3 的 EST 片段, 而可确认的 TUBB3 的 EST 片段序列中包含 3'端的 297 个氨基酸, 与其他物种 (440~450 氨基酸) 相比其 5'端尚不完整。因此,我们采用 RACE-PCR 方法获取多疣壁虎神经组织 TUBB3 的全长序列, 通过 Northern blotting 验证其转录本和大小, 进而构建其原核表达载体, 诱导表达并纯化了 TUBB3 蛋白, 免疫新西兰白兔, 制备了兔抗壁虎 TUBB3 多克隆抗体, 通过 ELISA 方法和 Western blot 检测多克隆抗体的效价和特异性, 为多疣壁虎神经组织的再生及 TUBB3 的功能研究提供相关的基础数据。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

BD SMART RACE cDNA Amplification Kit、HF DNA polymerase Kit (BD Biosciences Clontech), T4 DNA Ligase Kit、pGEM-T-easy Kit (Promega), 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒 (TIANGEN), 限制性内切酶 *EcoR I* 、*BamH I*、*Xho I* (TakaRa), 尼龙膜 (NYTRAN), DIG Northern Starter Kit (Roche), 丙烯酰胺, N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 (GIBCO), 10% AP、TEMED (Sigma), PVDF 膜 (Life Science), His-Tag 纯化试剂盒 (QIAGEN), pET-32a 质粒、DH5α和 BL21 菌株为本实验室保存。多疣壁虎和新西兰大白兔 (南通大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 RACE-PCR, Northern Blotting 和 RT-PCR 成年多疣壁虎冰上麻醉, 采用 Trizol 方法提取其脑和脊髓组织的总 RNA, 1%甲醛变性胶电泳检测其完整性并转膜, 紫外交联备用。按照说明合成壁虎脑和脊髓组织的 RACE cDNA 第一链, 分装并置 −20 °C 保存。设计 TUBB3 的 RACE 扩增引物 GSP1, 巢式验证引物 NGSP1 和 NGSP2, 序列见表 1。采用 touch down PCR 进行 5'RACE 扩增, 琼脂糖凝胶电泳回收预期大小的扩增条带, 与 T-easy 载体连接, 通过 DNA 测序分析获得 T-easy-gTUBB3 质粒, 测序工作由上海英骏公司完成。测序结果与 GenBank 中登录的其他物种 TUBB3 序列进行比对, 证实目的序列。以测序正确的序列 T-easy-gTUBB3 为模板, T7 和 SP6 RNA 聚合酶分别合成正义和反义 RNA 探针, 进行 Northern blotting 杂交验证 TUBB3 基因 cDNA 序列长度和转录本。RNeasy Mini Kit 法提取壁虎各组织(肝、肺、肾、心、脊髓、脑、卵巢)的总 RNA, 用 Sensiscript RT Kit 对各样品进行逆转录, RT-PCR 扩增 TUBB3,检测其在各组织中的表达, 同时扩增 EF-1α作为内参, 相关引物序列 TUBB3-F, TUBB3-R, EF-1α-F, EF-1α-R 序列见表 1。

表 1 实验中应用的引物及序列
Tab.1 Primers used in the experiments

引物 Primer	序列 Sequence (5'−3')
GSP1	*cggactcctcctcgtcatcctcgtacatc*
NGSP-up	*cgtgtaccagtggaggaagg*
NGSP-down	*catccagagcaagaacagca*
TUBB3-up	*ccggaattcatgagggagatcgtccac*
TUBB3-down	*ccgctcgagtcttggcaccttgggcc*
TUBB3-F	*Ctcacaagtatgttcctcgcgc*
TUBB3-R	*ggtggttgaggtctccgtaagtg*
EF-1α-F	*Catgtcgattctggcaagtc*
EF-1α-R	*Ctggctgtaaggtggctcag*

1.2.2 TUBB3 蛋白的氨基酸序列比对和进化树分析 采用 DNAstar 分析软件中的 MegAlign 工具进行多个物种 TUBB3 蛋白的氨基酸序列比对, 比较不同物种间 TUBB3 蛋白的序列差异; 采用 Phylip

3.5C 软件包 NJ 法构建了系统进化树(pseudo-replicates 为 1 000)，观察多疣壁虎的 TUBB3 蛋白同其他物种在进化上的距离关系。

1.2.3　原核表达载体构建　根据目的基因和载体的序列，选择 *EcoR I* 和 *Xho I* 为 5'端和 3'端的引入酶切位点，设计引物见附表 1，其中斜体部分为引入的酶切位点，酶切位点前为保护碱基序列。以 T-easy-gTUBB3 质粒为模板，高保真 DNA 聚合酶扩增，酶切胶回收片段，连接入线性化 pET-32a 质粒，DNA 测序分析获得 pET-32a-gTUBB3 表达质粒。

1.2.4　原核重组质粒的诱导表达、纯化　将测序验证正确的重组质粒 pET-32a-gTUBB3，转入 BL21 表达菌株进行诱导表达。取 1 mL 过夜培养物加入 50 mL 培养基中，37 °C 250 r/min 活化培养，OD_{600} 值达到 0.4~0.6 时，将细菌悬液分为 12 份各 5 mL，根据诱导温度分为 3 组，37 °C、 25 °C、16 °C，每组分 0.1、0.5、0.8 mmol/L 3 个终浓度的 IPTG 诱导表达，以确定最佳的 IPTG 诱导浓度，每组均设不加 IPTG 对照。实验中同步进行空载质粒 pET-32a 的对照诱导。分别收集各组诱导后的细菌悬液 5 mL，12 000 g 离心 1 min，加入 100 μL 磷酸缓冲盐(PBS)混和以重悬沉淀。用等体积 2× SDS 上样缓冲液裂解 15 min，然后迅速于沸水浴中 5 min 使蛋白变性。提取出的蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染胶以观察融合蛋白的表达。确定最佳表达条件后，再次诱导表达，采用 His-Tag 蛋白纯化试剂盒纯化诱导表达的目的蛋白，经 SDS-PAGE 分析鉴定后，用 BCA 蛋白定量试剂盒检测纯化蛋白的质量浓度，−20 ℃保存备用。

1.2.5　TUBB3 多克隆抗体的制备和纯化　将稀释后的纯化蛋白 2 mL (浓度为 0.5 mg/mL)，加入等体积的弗氏完全佐剂，按 0.6 mg/只的剂量注射两只新西兰大白兔 (1.5~2.0 kg)，常规皮下多点注射，进行首次免疫；首次免疫后 2 周，将纯化蛋白 0.5 mL 用 PBS 稀释后，混合等体积的弗氏不完全佐剂，按 200 μg/只的剂量对新西兰大白兔进行首次加强免疫免疫；一周后，同样的剂量进行再次加强免疫；再次加强免疫后 10 d，心脏穿刺采血收集兔血清，采用硫酸铵盐析沉淀法纯化收集的的抗血清，纯化产物经 SDS-PAGE 分析，−20 ℃保存备用。

1.2.6　ELISA 方法检测多克隆抗体的效价　将稀释后的纯化蛋白 (50 μg/mL) 按 100 μL/孔于 4 ℃包被酶标板过夜，弃上清，用 PBST 洗 3 次，脱脂牛奶 37 ℃封闭 30 min 后，PBST 洗涤 3 次，将待测血清按照体积比分别为 $1:2^2$、$1:2^4$、$1:2^6$、$1:2^8$、 $1:2^{10}$、$1:2^{12}$、$1: 2^{14}$、$1:2^{16}$、$1:2^{18}$ 稀释后作为一抗，100 μL/孔，同时设同等稀释度的非免疫兔血清为阴性对照，PBS 为空白对照；二抗为 1:10 000 稀释度的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 各 100 μL，37 ℃，30 min，PBST 洗涤后，每孔加入现配的底物 TMB 显色液，15 min 后 2 mol/L 硫酸终止显色，酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

1.2.7　Western blotting 方法检测多克隆抗体的特异性　纯化后的抗血清 0.25 μg 为一抗，进行多疣壁虎脑和脊髓组织蛋白的 Western blotting 检测，以重组蛋白 TUBB3 为阳性对照，同时以 His 标签抗体作对照，以检测所制备多克隆抗体的特异性和免疫学活性。

2　结果与分析

2.1　TUBB3 全长序列和 Northern blotting 验证

根据实验室建立的多疣壁虎脑和脊髓组织的 cDNA 文库中已知的 TUBB3 的 3'-EST 序列，按照 BD SMART RACE cDNA Amplification Kit 操作说明，通过 touch down RACE-PCR 获得 TUBB3 的 5'端序列 (图 1A)，经巢式 PCR 验证，序列测序，拼接后全长 1790 bp。NCBI 在线进行 Blastx 比对，与其他物种神经组织特异性的 TUBB3 蛋白高度同源，通过 Northern blotting 验证其序列长度约为 1.8 kb，有一个转录本 (图 1B)。使用在线工具 BankIt 登录 GenBank，登录号为 JQ080315。RT-PCR 检测其多组织表达谱，结果表明该基因在脑和脊髓中表达(图 1C)。

2.2　TUBB3 基因序列和进化树分析

通过 RACE-PCR 扩增获得多疣壁虎神经组织的 TUBB3 基因序列，全长为 1790 bp，编码区 1350 bp，编码 450 个氨基酸，序列 3’端有加尾信号 *AATAAA*，跟其他物种 TUBB3 蛋白高度同源 (图 2A)。根据 NJ 法构建的系统进化树结果表明多疣壁虎的 TUBB3 蛋白和鸡的 TUBB3 蛋白在进化距离上比较近(图 2B)。

2.3　TUBB3 蛋白的的诱导表达和纯化

重组质粒 pET-32a-gTUBB3 在 BL21 菌株中表达，按照获得的最佳条件诱导表达：IPTG 浓度 0.1

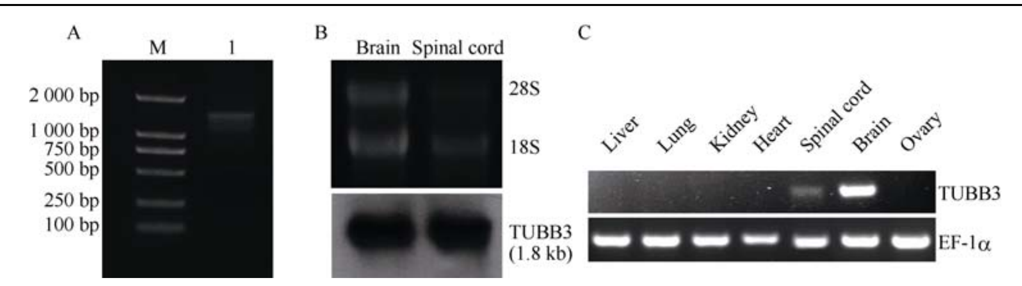


图 1 TUBB3 基因的 RACE-PCR 扩增产物和 Northern blotting 结果

Fig. 1 The products of RACE-PCR and the result of Northern blotting of gecko TUBB3 gene

A）M: DL2000 DNA Marker; 1: TUBB3 的 RACE-PCR 产物; B）上图为多疣壁虎脑和脊髓组织 RNA 电泳, 下图为 TUBB3 基因的 Northern blotting 结果; C）RT-PCR 检测 TUBB3 的多组织表达, TUBB3 仅在脑和脊髓中表达。

A) Lane M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: Product of 5' RACE-PCR; B) The upper panel shows the total RNA from the gecko brain and spinal cord, and below shows the result of Northern blotting of gecko TUBB3 gene; C) The expression of TUBB3 in multi-tissue by RT-PCR, TUBB3 was detected only in brain and spinal cord.

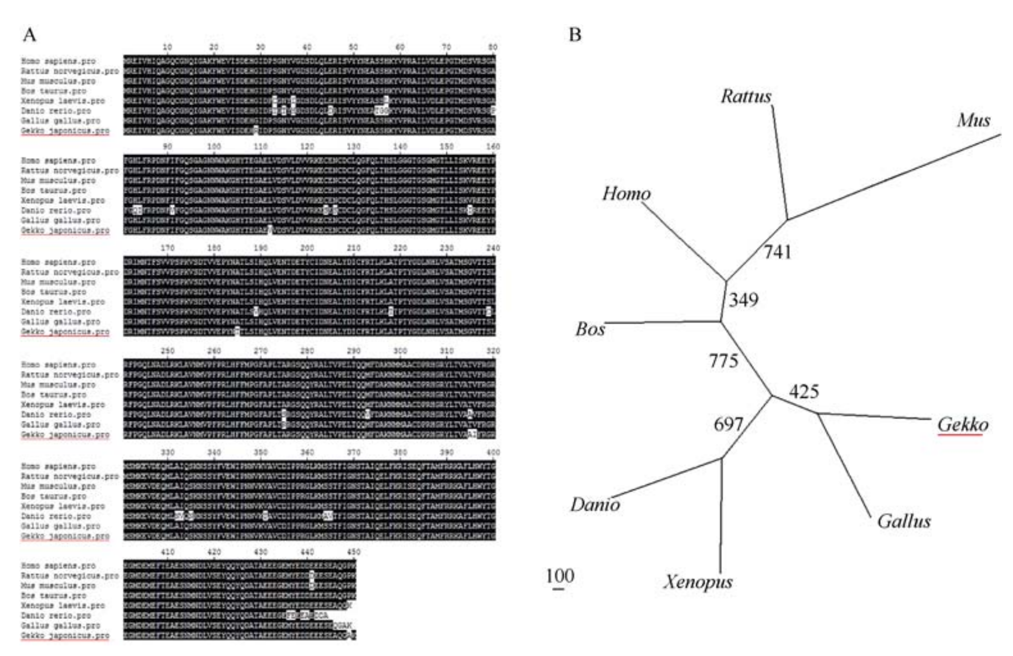


图 2 TUBB3 基因序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of TUBB3 gene

A）多疣壁虎和其他物种 (人、大鼠、 小鼠、牛、 鸡、爪蟾、 斑马鱼) TUBB3 蛋白序列比对; B）多疣壁虎和其他物种 (人、 大鼠、小鼠、牛、 鸡、爪蟾、斑马鱼) TUBB3 蛋白的进化树分析。

A) Alignment of gecko TUBB3 protein with other seven representative species: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*; B) Unrooted phylogenetic tree of gecko TUBB3 and other known TUBB3 from seven representative species.

mmol/L, 16℃, 150 r/min, 16 h, 获得带有 His Tag 标记的 TUBB3 融合蛋白，相对分子质量大小约为 6.7×10^4 (图 3A)。采用 His Tag 蛋白纯化试剂盒纯化 TUBB3 融合蛋白，并经过 SDS-PAGE 电泳分析，获得清晰的融合蛋白条带 (图 3B), BCA 蛋白定量试剂盒检测获得的纯化蛋白质量浓度为 5.43 mg/mL。

2.4 TUBB3 多克隆抗体的效价和特异性检测

经 ELISA 检测，抗体效价大于 1:65 536。采用纯化后的血清抗体检测纯化的 His 融合 TUBB3 蛋白，同时利用 His 标签抗体作为对照，结果显示纯化后的血清抗体与 His 融合的 TUBB3 表达蛋白具有特异性的结合反应 (图 4A)。将获得的多克隆抗体稀释后作为一抗，对多疣壁虎脑和脊髓组织蛋白进行 Western blotting 检测，在预期相对分子质量 4.95×10^4 处可见明显目的条带 (图 4B), 表明制备的多克隆抗体具有较好的特异性。

3 讨 论

高等哺乳动物成体中枢神经损伤后不能再生，神经损伤修复再生一直以来是神经科学领域研究

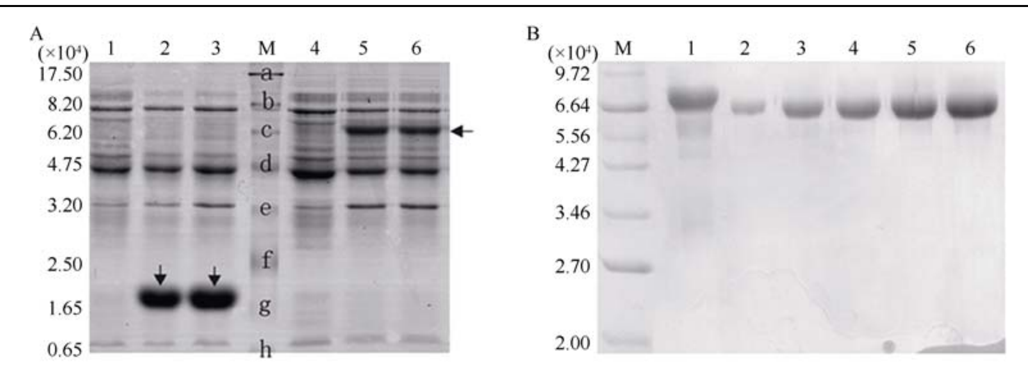


图 3　TUBB3 融合蛋白的诱导表达和纯化后的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3　The PAGE result of expression and purification of His fused TUBB3 protein

A）诱导表达的 TUBB3 融合蛋白, 大小约 6.7×10^4 (←), 空载体蛋白约 1.75×10^4 (↓)。1 和 4: 未诱导的 pET-32a 和 pET-32a-TUBB3 质粒的总蛋白; M: 标准蛋白 Marker, a-h 示各条带相对分子质量, 大小如 1 左侧所示; 2 和 3 均为 0.1 mmol/L IPTG 诱导的 pET-32a 总蛋白; 5 和 6 均为 0.1 mmol/L IPTG 诱导的 pET-32a-TUBB3 质粒的总蛋白。B）TUBB3 融合蛋白的纯化, M: 标准蛋白 Marker, 1: 纯化的 TUBB3 融合蛋白, 上样量 2 μL; 2−6: 牛血清白蛋白(BSA), 上样量分别为 1、2、3、4 和 5 μg。

A) showed the result of inducing expression of His fused gecko TUBB3 protein with 6.7×10^4 MW (←), while the MW of the His tag protein of pET-32a vector was about 1.75×10^4 (↓). Lane 1 and 4 showed the total protein of uninduced pET-32a vector and pET-32a-TUBB3 plasmid. Lane 2 and 3 showed the induced total protein of pET-32a vector, while the lane 5 to 6 showed the induced total protein of pET-32a-TUBB3 plasmid. The bands from a to h in lane M showed the standard MW protein, and their MW list at the right of the Lane 1 respectively. B) Land 1 showed the result of purification of His fused gecko TUBB3 protein, which loading volume was 2 μL. The lanes of 2 to 6 were the BSA protein, their loading volume were 1 μg, 2 μg, 3 μg, 4 μg and 5 μg respectively. Lane M showed the standard MW protein.

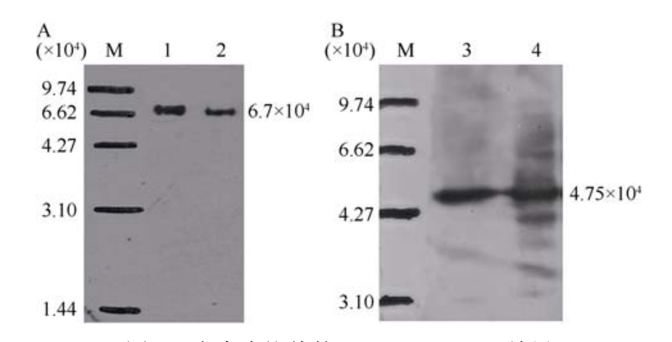


图 4　多克隆抗体的 Western blotting 结果

Fig. 4　The result of Western blotting using the generated TUBB3 antibody

A）纯化的多克隆血清抗体与带 His 标签蛋白的 TUBB3 蛋白的 Western blotting 验证。1, 血清与 His 融合 TUBB3 表达蛋白的 Western blotting 结果; 2, His 标签抗体与 His -TUBB3 融合蛋白的 Western blotting 结果。B）多克隆抗体在多疣壁虎脑(3)和脊髓组织(4)总蛋白的 Western blotting 结果。

A) Showed the result of Western blotting using His-tagged gecko TUBB3 protein as the antigen. Lane M, standard MW protein; Lane 1, showed the result of Western blotting by using the generated rabbit polyclonal antibody against His-tagged gecko TUBB3 protein, while lane 2 showed the results of Western blotting by using commercial monoclonal antibody against His protein. B) Showed the result of Western blotting using the total protein from gecko brain (lane 3) and spinal cord (lane 4) as the antigen. Lane M, standard MW protein.

的热点, 但尚未取得突破性进展。探讨高等动物脊髓再生的另一个思路是研究具有脊髓再生能力的低等动物脊髓再生现象, 通过了解它们脊髓再生的机制为高等动物的脊髓再生提供有价值的线索。因此, 我们实验室选取了一种爬行动物作为脊髓再生的研究对象, 即多疣壁虎(*Gekko japonicus*, Gecko)。壁虎是一种再生能力极强的动物, 受到攻击时其尾部能主动断离作为一种逃避手段, 而且尾部断离后一般能够进行完整的形态再生和功能恢复, 其中包括脊髓的再生, 这种脊髓再生模型相对简单, 并且效应明确。有关低等动物脊髓再生的模型已有较多报道(Alibardi, 1995; Cristino et al, 2000; Echeverri & Tanaka, 2002), 主要是集中在两栖类, 尤其是蝾螈, 当然也包括更为低等的斑马鱼等作为模型, 爬行类的模型相对较少，但是爬行类动物从进化上来看更为高等, 已经属于羊膜动物, 因此，其脊髓再生的模式及相关的机制可能更接近于哺乳类，并且随着爬行类动物基因组及转录组数据的不断丰富，原来爬行类再生研究的基础数据瓶颈将很快突破。

我们实验室以多疣壁虎为中枢神经损伤和修复再生的研究对象，已经开展了一系列的研究，构建了多疣壁虎的脑和脊髓组织的 cDNA 文库(Liu et al, 2006) , 确定了神经系统细胞的培养方法 (Gu et al, 2007), 建立了永生化神经系统细胞株 (Liu et al, 2010)，采用流式方法测定了多疣壁虎基因组大小(Liu et al, 2010a), 并针对与神经损伤再生相关基因 CD59 (Wang et al, 2011)、Noggin2 (Liu et al, 2010b) , GFAP (Gao et al, 2010)、 PDGF-C(Liu et al, 2009) 等进行了较为深入的研究。我们已经积累了多疣壁虎的8000余条EST, 我们可以从中挑选一些具有重要功能的基因进行克隆及相关的功能研究。我们

采取的主要方法是RACE-PCR技术，即cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)，来得到完整的cDNA5'和3'端。我们用该方法成功获得多疣壁虎微管蛋白TUBB3的全长cDNA序列。序列中ORF区长1 350 bp，编码450个氨基酸，经蛋白序列比对发现多疣壁虎的TUBB3蛋白跟其他物种的TUBB3蛋白高度同源，说明TUBB3蛋白在进化中十分保守。采用NJ进化树分析发现，作为一个低等的脊椎动物，多疣壁虎的TUBB3蛋白与鸡、非洲爪蟾的TUBB3蛋白在进化距离上比较近，而与人、大鼠和小鼠的的亲缘关系相对较远，符合进化规律。为了制备壁虎TUBB3特异的抗体，我们应用了pET原核表达系统，该系统带有的不同融合标签蛋白更有利于表达蛋白的纯化(Choi et al, 2010)。在不同的诱导表达条件下检测重组蛋白的表达效率，最终选择终浓度0.1 mmol/L IPTG, 16 ℃, 150 r/min, 16 h的诱导表达条件，不但增加可溶性蛋白的表达量，也可以较好地控制表达蛋白的质量，特异性地表达融合蛋白，免疫动物后，成功获得抗血清，为多疣壁虎在再生研究方面提供一个抗体工具。

该抗体在壁虎的相关后续研究中将得到广泛的应用，比如对相关细胞的标记及示踪实验，我们在壁虎神经干细胞的分离、分化实验，脊髓损伤后新生神经元的标记等实验中都成功地应用了该抗体。另外，TUBB3蛋白除了是神经元的标记蛋白外，本身也有重要的生物学功能，它是细胞的基本骨架成分之一，在维持神经元特殊形态和功能中发挥着重要的作用。近来的研究表明了TUBB3在神经发育和疾病中有新的作用，TUBB3的突变可导致脑皮层发育畸形和神经元迁移缺陷 (Gumy et al, 2011; Poirier et al, 2010)、干扰微管的动态和轴突的导向(Tischfield et al, 2010)等。本实验的工作也为壁虎TUBB3的功能研究打下基础。

参考文献：

Abdollahi MR, Morrison E, Sirey T, Molnar Z, Hayward BE, Carr IM, Springell K, Woods CG, Ahmed M, Hattingh L, Corry P, Pilz DT, Stoodley N, Crow Y, Taylor GR, Bonthron DT, Sheridan E. 2009. Mutation of the variant α-tubulin TUBA8 results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia [J]. *Am J Hum Genet,* **85**(5): 737-744.

Alibardi L. 1995. Muscle differentiation and morphogenesis in the regenerating tail of lizards [J]. *J Anat,* **186**(Pt 1): 143-151.

Burns RG. 1991. α-,β-, and γ-tubulins: sequence comparisons and structural constraints [J]. *Cell Motil Cytoskeleton,* **20**(3): 181-189.

Choi YJ, Morel L, Le François T, Bourque D, Bourget L, Groleau D, Massie B, Míguez CB. 2010. Novel, versatile, and tightly regulated expression system for *Escherichia coli* strains [J]. *Appl Environ Microbiol,* **76**(15): 5058-5066.

Cristino L, Pica A, Della Corte F, Bentivoglio M. 2000. Plastic changes and nitric oxide synthase induction in neurons which innervate the regenerated tail of the lizard *Gekko gecko*: II. The response of dorsal root ganglion cells to tail amputation and regeneration [J]. *Brain Res,* **871**(1): 83-93.

Echeverri K, Tanaka EM. 2002. Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration [J]. *Science,* **298**(5600): 1993-1996.

Gao DH, Wang YJ, Liu Y, Ding F, Gu XS, Li ZL. 2010. The molecular cloning of glial fibrillary acidic protein in Gekko japonicus and its expression changes after spinal cord transection [J]. *Cell Mol Biol Lett,* **15**(4): 582-599.

Gu Y, Liu M, Liu Y, Gu XS. 2007. Isolation, culture and purification of cerebral cortical neurons and glial cells from the embryonic gecko [J]. *Acta Anat Sin,* **38**(4): 489-493. [顾芸, 刘梅, 刘炎, 顾晓松. 2007. 壁虎胚胎大脑皮层神经元和胶质细胞的分离、培养及纯化. 解剖学报, **38**(4): 489-493.]

Gumy LF, Yeo GSH, Tung YCL, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BYH, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW. 2011. Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization [J]. *RNA,* **17**(1): 85-98.

Hoffman PN. 1988. Distinct roles of neurofilament and tubulin gene expression in axonal growth [J]. *Ciba Found Symp,* **138**: 192-204.

Isaev DA, Garitaonandia I, Abramihina TV, Zogovic-Kapsalis T, West RA, Semechkin AY, Müller AM, Semechkin RA. 2012. *In vitro* differentiation of human parthenogenetic stem cells into neural lineages [J]. *Regen Med,* **7**(1): 37-45.

Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian GL, Bahi-Buisson N, Fallet-Bianco C, Phan-Dinh-Tuy F, Kong XP, Bomont P, Castelnau-Ptakhine L, Odent S, Loget P, Kossorotoff M, Snoeck I, Plessis G, Parent P, Beldjord C, Cardoso C, Represa A, Flint J, Keays DA, Cowan NJ, Chelly J. 2009. Mutations in the β-tubulin gene *TUBB2B* result in asymmetrical polymicrogyria [J]. *Nat Genet,* **41**(6): 746-752.

Keays DA, Tian GL, Poirier K, Huang GJ, Siebold C, Cleak J, Oliver PL, Fray M, Harvey RJ, Molnár Z, Piñon MC, Dear N, Valdar W, Brown SDM, Davies KE, Rawlins JNP, Cowan NJ, Nolan P, Chelly J, Flint J. 2007. Mutations in α-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans [J]. *Cell,* **128**(1): 45-57.

Kobayashi N, Mundel PA. 1998. A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells [J]. *Cell Tissue Res,* **291**(2): 163-174.

Liu M, Gu Y, Liu Y, Li J, He JH, Lin SY, Gu XS. 2010. Establishment and characterization of two cell lines derived from primary cultures of *Gekko japonicus* cerebral cortex [J]. *Cell Biol Int,* **34**(2): 153-161.

Liu Y, Ding F, Liu M, Jiang MR, Yang H, Feng X, Gu XS. 2006. EST-based identification of genes expressed in brain and spinal cord of *Gekko japonicus*, a species demonstrating intrinsic capacity of spinal cord regeneration [J]. *J Mol Neurosci,* **29**(1): 21-27.

Liu Y, Fan Z, Zhou YL, Liu M, Ding F, Gu XS. 2009. The molecular cloning of platelet-derived growth factor-C (*PDGF-C*) gene of *Gekko japonicus* and its expression change in the spinal cord after tail amputation [J]. *Cell Mol Neurobiol,* **29**(2): 263-271.

Liu Y, Li J, Gu Y, Shen M, Wang YJ, Liu M. 2010a. Determination of DNA

content of *Gekko japonicus* by flow cytometry [J]. *J Anhui Agric Univ,* **37**(4): 609-613.

Liu Y, Zhou YL, Qian YY, Wang YJ, Ding F, Gu XS, Liu M. 2010b. The noggin2 gene of Gekko japonicus (Gekkonidae) is down-regulated in the spinal cord after tail amputation [J]. *Genet Mol Res*, **9**(3): 1606-1614.

Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, Castelnau-Ptakhine L, Roubertie A, Attie-Bitach T, Desguerre I, Genevieve D, Barnerias C, Keren B, Lebrun N, Boddaert N, Encha-Razavi F, Chelly J. 2010. Mutations in the neuronal ß-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects [J]. *Hum Mol Genet,* **19**(22): 4462-4473.

Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, Chan WM, Andrews C, Demer JL, Robertson RL, Mackey DA, Ruddle JB, Bird TD, Gottlob I, Pieh C, Traboulsi EI, Pomeroy SL, Hunter DG, Soul JS, Newlin A, Sabol LJ, Doherty EJ, de Uzcátegui CE, de Uzcátegui N, Collins MLZ, Sener EC, Wabbels B, Hellebrand H, Meitinger T, de Berardinis T, Magli A, Schiavi C, Pastore-Trossello M, Koc F, Wong AM, Levin AV, Geraghty MT, Descartes M, Flaherty M, Jamieson RV, Møller HU, Meuthen I, Callen DF, Kerwin J, Lindsay S, Meindl A, Gupta ML Jr, Pellman D, Engle EC. 2010. Human *TUBB3* mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance [J]. *Cell,* **140**(1): 74-87.

Wang YJ, Wang RL, Jiang SJ, Zhou WJ, Liu Y, Wang YJ, Gu Q, Gu Y, Dong YY, Liu M, Gu XX, Ding F, Gu XS. 2011. Gecko CD59 is implicated in proximodistal identity during tail regeneration [J]. *PLoS One,* **6**(3): e17878.